

USP15 Regulates Neuromuscular Functions through the Control of RNA Splicing

著者	KIM Jaehyun
発行年	2018
その他のタイトル	USP15によるRNAスプライシングを介在した神経筋の機能制御メカニズムの解析
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2017
報告番号	12102甲第8557号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00152916

氏名	金 材炫		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲 第 8557 号		
学位授与年月日	平成 30年 3月 23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	USP15 Regulates Neuromuscular Functions through the Control of RNA Splicing (USP15 による RNA スプライシングを介在した神経筋の機能制御メカニズムの解析)		
主査	筑波大学教授	博士(医学)	千葉 智樹
副査	筑波大学教授	博士(理学)	中田 和人
副査	筑波大学教授	博士(農学)	三浦 謙治
副査	筑波大学教授	理学博士	中村 幸治

論 文 の 要 旨

ユビキチンシステムは、タンパク質を可逆的にユビキチン修飾し、タンパク質の恒常性維持や品質管理、遺伝子の転写、翻訳、シグナル伝達や小胞輸送など、細胞内の様々な生命現象を制御している。このシステムが破綻すると、様々な生体システムに影響のあることが知られている。中でも、脱ユビキチン化反応を担っている脱ユビキチン化酵素の機能異常は、神経変性疾患や免疫疾患、癌を始めとする様々な疾患を誘発する。約 100 種類存在する脱ユビキチン化酵素の一員である USP15 は、TGFβ シグナル伝達経路、転写因子 NFκB 経路、Keap1-Nrf2 経路など、様々な細胞内シグナル伝達経路を調節し、炎症性反応や酸化ストレス応答などを制御する。また glioblastoma 患者脳や脊髄小脳変性症モデルマウスで USP15 は異常発現していることが報告されている。そのため USP15 は神経機能維持及び神経疾患発症に関与すると推測されているが、その分子メカニズムの詳細は明らかでない。

そこで本論文の著者は、生体における USP15 の機能を明らかにすることを目的として、第 1 章において USP15 遺伝子欠損マウスの表現型を解析した。その結果著者は、USP15 欠損マウスは体の大きさが野生型に比べ小さくなり、月齢依存的に軽度の振戦や歩行異常、抱擁反射の異常など、典型的な運動失調症状を示すことを明らかにした。さらに著者が脳と骨格筋の病理像を解析した結果、大脳皮質の層構造や小脳の枝構造に異常が見られ、月齢依存的に小脳のプルキンエ細胞が脱落していた。また骨格筋においては筋繊維の太さが野生型に比べ細くなっていた。このことから、USP15 は神経筋の機能維持に重要なはたらきをもつことが示された。

次に著者は第 2 章において、第 1 章で観察された症状の分子機序を明らかにする目的で、USP15 が脱ユビキチン化する基質を探索した。USP15 は数多くの U4/U6 スプライソソーム関連因子と結合したことから、著者は USP15 が mRNA のスプライシング関連因子群を標的とするのではないかと推測した。標的因子の候補

として同定された Terminal Uridyl Transferase (TUT1) は U6-snRNA の 3'末端にポリ U を付加する酵素である。解析の結果、USP15 は TUT1 と結合し、TUT1 の脱ユビキチン化を促進した。

著者は第 3 章において、TUT1 を修飾するポリユビキチン鎖を解析し、それが K63 ポリユビキチン鎖であったことから、USP15 による TUT1 の脱ユビキチン化制御はタンパク質の安定化とは異なる機能を持つことが推察された。

また第 4 章で著者は、TUT1 以外に同定された候補タンパク質である Squamous cell carcinoma Antigen Recognized by T cells 3 (SART3) を解析している。SART3 は U4/U6 スプライソソームの会合に寄与するタンパク質である。解析の結果、SART3 は USP15 と TUT1 の足場タンパク質として機能し、両者の結合と脱ユビキチン化反応を促進することを明らかにした。

そして第 5 章において著者は、TUT1 の細胞内局在を解析した。TUT1 は核小体に存在しているが、その脱ユビキチン化は TUT1 を核質に移行させることが明らかとなった。

第 6 章で著者は、実際に USP15 が RNA スプライシングを制御するのか検討した。まず USP15 欠損によって U4-snRNA と U6-snRNA が影響を受けるのか解析した結果、USP15 欠損マウスでは U4/U6-snRNA の発現量が野生型と比べて変化していた。さらに RNA スプライシングにも異常が生じているのか、Affymetrix GeneChip Exon array を用いて解析した。その結果、USP15 欠損マウスの小脳と骨格筋において、数多くの遺伝子がスプライシング異常を起こしていることが判明した。

しかし USP15 欠損マウスの症状は予想に反して重篤ではないため、著者は USP15 のホモログである USP4 が USP15 の機能を一部代償しているのではないかと推察し、第 7 章において、USP4 も RNA スプライシング関連因子群の制御に関わるか解析した。その結果、USP4 も USP15 と同様に TUT1 を脱ユビキチン化し、核小体における局在も制御することが明らかとなった。

著者は、第 8 章において TUT1 のユビキチン化制御に関わりうるユビキチンリガーゼ KLHL7 について解析した。KLHL7 は網膜色素変性症の原因遺伝子産物であり、KLHL7 結合タンパク質の一つとして USP15 および U4/U6 スプライソソーム関連因子が同定されていた。そこで KLHL7 が TUT1 のユビキチン化制御に関わるのか解析した結果、KLHL7 も TUT1 の核小体局在を制御することが判明した。この核局在の変化は網膜色素変性症の点突然変異である A153V および A153T 変異体では観察されなかった。そのため KLHL7 のユビキチンリガーゼ活性は TUT1 の局在制御に重要であることが判明した。

以上、本論文では USP15 が RNA スプライシング制御に関わること、その機能欠損は運動障害や神経変性に繋がることを示した。また USP15 欠損マウスにおいて RNA スプライシング異常となった遺伝子群を解析することで、様々な神経疾患の解明に貢献できることが期待される。

審 査 の 要 旨

本論文において著者は、神経筋機能の制御に重要なユビキチンシステムの役割を解明するため、脱ユビキチン化酵素 USP15 に着目して、その遺伝子欠損マウスの解析ならびに脱ユビキチン化される標的分子の解析を行った。その結果著者は、USP15 が RNA 代謝酵素の制御に関与すること、そして USP15 遺伝子欠損マウスでは mRNA がスプライシング異常となり神経変性疾患様症状を呈することを明らかにした。本論文の一連の成果は、ユビキチン修飾機構が RNA 代謝においても重要な役割を果たしていることを示しており、その可逆的制御の一端を明らかにした点で高く評価される。

平成 30 年 1 月 30 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。